

SEP 25 2003

COLORING MATTER SIMILAR TO MONONUCLEOTIDE FOR DNA @ {3754/24}RNA) AND DNA @ {3754/24}RNA) PROBE

Patent Number: JP6122696
Publication date: 1994-05-06
Inventor(s): TOMITA YOSHINORI; others: 02
Applicant(s): CANON INC
Requested Patent: ☐ JP6122696
Application Number: JP19920272914 19921012
Priority Number(s):
IPC Classification: C07H19/04; C07H21/02; C07H21/04; C12Q1/68
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject new coloring matter having general purpose, providing a DNA (RNA) probe capable of measuring a nucleic acid in high sensitivity, comprising a coloring matter, phosphate group and a saccharide wherein the saccharide is linked to the phosphate group by ester bond and to the coloring matter by glycoside bond.

CONSTITUTION: 2,3,3-Trimethyl-indolenine of formula I is reacted with ethyl iodide and 1-iodo-5-dimethoxytrityl-2-deoxy-D-ribose of formula II (R is dimethoxytrityl, acetyl or benzyl; Ac is acetyl), separately respectively, to give a compound of formula III and a compound of formula IV and both the compounds are reacted in methanol. Then the reaction product is hydrolyzed to give a coloring matter of formula V similar to nucleotide, which is treated with 3' hydroxyl group of 2-cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphadiamidite saccharide and phosphorylated to give the objective coloring matter such as objective DNA (RNA) probe containing a coloring matter, phosphate group and a saccharide.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-122696

(43) 公開日 平成6年(1994)5月6日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 19/04				
21/02				
21/04	Z			
C 1 2 Q 1/68	A	7823-4B		

審査請求 未請求 請求項の数6 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平4-272914	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成4年(1992)10月12日	(72) 発明者	富田 佳紀 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内
		(72) 発明者	三原 知恵子 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内
		(72) 発明者	岡本 尚志 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 丸島 儀一

(54) 【発明の名称】 DNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素およびDNA (RNA) プローブ

(57) 【要約】

【構成】 色素、リン酸基、および糖を含み、糖類が1基から3基のリン酸基あるいはリン酸基誘導体にエステル結合し、該糖類が該色素とグリコシド結合していることを特徴とするDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素、該色素を結合したDNA (RNA) プローブ、及び該DNA (RNA) プローブを用いるDNA検出方法。

【効果】 本発明のDNAプローブ用色素は多量に合成でき、水溶性であり、DNAプローブに簡便に、且つ定量的に導入できる。また該色素を導入したDNAプローブは、高感度な測定が可能で、検出したい核酸の塩基配列に依存しない汎用性を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アゾ色素、アントラキノ色素、インジゴイド色素、フタロシアニン色素、カルボニウム色素、キノイミン色素、メチン色素、キノリン色素、ニトロ色素、ニトロソ色素、ベンゾキノ色素、ナフトキノ色素、ナフタルイミド色素、ペノリン色素、アズレン色素から選ばれる少なくとも1つの色素、リン酸基、および糖を含み、糖類が1基から3基のリン酸基あるいはリン酸基誘導体にエステル結合し、該糖類が該色素とグリコシド結合していることを特徴とするDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素。

【請求項2】 該糖類の遊離水酸基に保護基を付加したことを特徴とする請求項1に記載のDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素。

【請求項3】 該色素のモル吸光係数 (ϵ) が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ である請求項1もしくは2記載のDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素。

【請求項4】 ポリもしくはオリゴヌクレオチドの5'末端および/もしくは3'末端に、請求項1～3何れかに記載のDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素をリン酸基を介して結合しポリもしくはオリゴヌクレオチドとしたことを特徴とするDNA (RNA) プローブ。

【請求項5】 ポリもしくはオリゴヌクレオチドの5'末端および/もしくは3'末端に、請求項1～3何れかに記載の複数のDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素をリン酸基を介して結合しポリもしくはオリゴヌクレオチドとしたことを特徴とするDNA (RNA) プローブ。

【請求項6】 DNAプローブと試料DNAを混合し、試料DNAに含まれるターゲットDNAとDNAプローブが形成するハイブリット体を検出することによりDNAを検出するDNA検出方法において、該DNAプローブが請求項4もしくは5記載のDNAプローブであることを特徴とするDNA検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はDNAまたはRNA内の特定の塩基配列の有無を検出するためのDNA (またはRNA) プローブ、及び該プローブ用色素に関する。

【0002】

【従来の技術】 DNAプローブとはDNA内の特定の塩基配列を検索するために、検索したいDNA (ターゲットDNA) の塩基配列と相補的な塩基配列を持つ (1本鎖) オリゴヌクレオチドあるいはDNAになんらかの物質を標識したものである (RNAプローブについても同様なので以下DNAについて説明する)。

【0003】 従来、DNAプローブの標識物質としては放射性同位元素を用いる方法があった。これはリンなどを放射性同位元素で置換したもので、オートラジオグラ

フィーやガイガーカウンターなどで検出していた。

【0004】 しかし、この放射性同位元素を用いる方法は、危険であり、放射性同位元素取り扱い施設やガイガーカウンターなどの設備が必要なうえに、人体内での検査には用いることができないという欠点があった。

【0005】 そこで非放射性物質を標識物質として用いる方法が一般的に行われてきている。かかる物質としては発色、蛍光または発光等を示す物質が用いられている。

【0006】 例えばウラシルにビオチンを結合させることが可能であり、これをニックトランスレーションと呼ばれる手法でチミンと置換させてDNAプローブとし、色素等を結合したアビジン又はストレプトアビジンをビオチンと結合することにより検出する方法がある (ビオチンDNAプローブ法と呼ぶ)。

【0007】 また、核酸塩基を反応基を導入したプリン環誘導体あるいはピリミジン環誘導体とする (例えば、蛍光を有するエテノアデノシンなど) 方法も行われている。

【0008】 更に、DNAを構成する塩基・糖類・リン酸基と反応する色素をDNAに化学的に反応させてDNAプローブを作成したり、DNAと直接反応させるのではなく、例えば β -アミンリンカー (MILLIPORE社製) などをオリゴヌクレオチドの5'末端に結合させ、カルボキシル基やスクシンイミド基を有する色素と反応させる方法もある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらの方法は何れも様々な欠点があった。

【0010】 即ち、ビオチンDNAプローブ法は感度がDNA内のチミン (ウラシル) 存在比率に依存してしまうという欠点があった。

【0011】 エテノアデノシンを用いる方法は、蛍光波長が限定され、かつ蛍光強度が弱いという欠点があった。

【0012】 また、DNAに色素等を標識する方法、例えば β -アミンリンカーを導入後、色素を反応させるという2段階反応なのでより簡単な方法が認められていた。

【0013】 さらに、この方法では微量しか入手できないDNAというポリマーに化学的な反応でモノマーである色素を付加しようとしていたので収率が悪いという問題点もあった。加えて、DNAは水溶性であり、色素は一般に水には溶けにくく、反応性が悪いという欠点もあった。これを改良するために特開平2-191674ではシアニン色素にスルホン基を導入して溶けやすくしている。

【0014】 そこで、本発明の目的は、多量に合成でき、水溶性であり、DNAプローブに簡便に、且つ定量的に導入できるDNAプローブ用色素を提供することで

3

ある。

【0015】また、本発明の別の目的は、高感度な測定が可能で、検出したい核酸の塩基配列に依存しない汎用性のあるDNAプローブを提供することである。

【0016】上記目的は以下の本発明により達成される。

【0017】即ち、本発明は、アゾ色素、アントラキノ色素、インジゴイド色素、フタロシアニン色素、カルボニウム色素、キノンイミン色素、メチン色素、キノリン色素、ニトロ色素、ニトロソ色素、ベンゾキノン色素、ナフトキノン色素、ナフタルイミド色素、ペノリン色素、アズレン色素から選ばれる少なくとも1つの色素、リン酸基、および糖を含み、糖類が1基から3基のリン酸基あるいはリン酸基誘導体にエステル結合し、該糖類が該色素とグリコシド結合していることを特徴とするDNA (RNA) プローブ用モノヌクレオチド類似色素、該色素を結合したDNA (RNA) プローブ、及び該DNA (RNA) プローブを用いたDNA検出方法である。

【0018】本発明は新規なDNAプローブ試薬用色素を原料として用い、新規な合成方法で色素標識したDNAプローブ試薬に関する。

【0019】本発明の色素は窒素を含む複素環化合物であり、核酸を構成するプリン誘導体やピリミジン誘導体からなる塩基と構造、性質が類似している。本発明者はこの特徴をいかして、人工的なDNA合成にこの色素を応用できることを知見した。すなわち、従来モノヌクレオチドとして(デオキシ)アデニル酸、(デオキシ)グアニル酸、(デオキシ)シチジル酸、ウリジル酸、チミジル酸を用いている代わりに本発明のDNA (RNA) プローブ試薬用色素を導入したモノヌクレオチド類似物質を用いてポリヌクレオチド人工合成を行う。これにより、モノヌクレオチド類似物質は化学的な反応で大量生産できるのでDNAプローブ試薬用色素を大量に得ることができる。

【0020】更に、本発明では選択できる色素の幅が広がったため、測定法により所望の吸収極大波長を持つモル吸光係数の高い色素を選択できる。

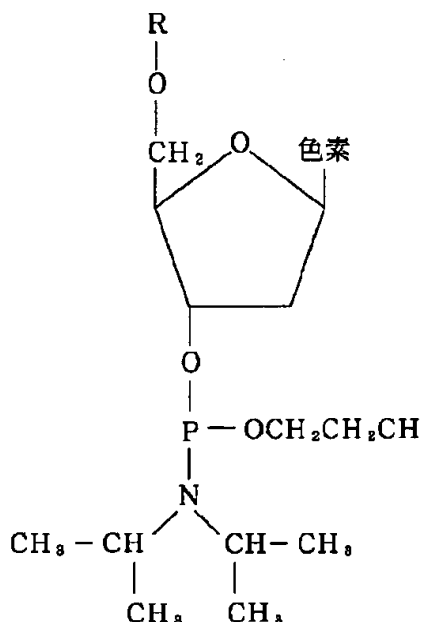
【0021】また本発明によれば色素に糖とリン酸が付くことにより水溶性が向上した。

【0022】本発明の目的とするDNAプローブ試薬用色素およびDNAプローブ試薬の構造式の一例を以下に示す。

【0023】

【外1】

4



(R は H、DMTr、または MMTr)

【0024】本発明のリン酸基とは核酸内に存在する無機リン酸基である。

【0025】また、リン酸基誘導体とはDNAを人工的に合成する場合の無機リン酸基保護誘導体と同じくβ-シアノエチルリン酸やモノメチル化リン酸などである。さらには化学的なDNA合成反応を用いるときにはリン酸N、N-ジイソプロピルアミド誘導体であることが望ましい。

【0026】本発明の糖類とは、リボース、2-デオキシリボースなどのペントース類、D-グルコース、α-D-グルコピラノースなどおよびそれらの誘導体である。

【0027】糖類の5'-ヒドロキシル保護基としてはジメトキシトリチル基 (以下DMTr) やモノメトキシトリチル基 (以下MMTr) が一般に用いられる。

【0028】リン酸と糖類とは核酸と同様のエステル結合をしている。リン酸はモノリン酸、ジリン酸、トリリン酸の1基から3基までの形を取りうるが一般にはモノリン酸である。

【0029】本発明では色素が上記の糖類とグルコシド結合していることを特徴とするが必ずしもN-グリコシド結合でなくても、C-グルコシド結合でもよい。

【0030】核酸ではアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルといったプリン誘導体あるいはピリミジン誘導体が糖類とグルコシド結合しているが、本発明ではこの部分を色素に置き換えたことにより従来とは異なるDNA (RNA) プローブ試薬用色素とすることができた。

【0031】上述したように、本発明では、従来モノヌ

クレオチドを原料として用いていたポリヌクレオチド人工合成法を、モノヌクレオチド類似物質としてのDNA (RNA) プローブ試薬用色素に応用する。よって本発明のDNA (RNA) プローブ試薬用色素を構成する色素部分は一般に窒素を含む複素環化合物で、核酸を構成するプリン誘導体やピリミジン誘導体からなる塩基と構造、性質が類似しているものが好ましい。含窒素化合物以外でも含硫黄化合物、含酸素化合物、含セレン化合物なども用いることができる。これらの色素部分に要求される条件として、できあがったモノヌクレオチド類似のDNA (RNA) プローブ試薬用色素が、核酸と類似した性質、例えば溶媒に対する溶解性やポリヌクレオチド末端との反応性あるいは副反応を起こさないことなどである。すなわち、従来の核酸モノマーを原料としたポリヌクレオチド人工合成法が応用できることあるいは簡単な変更で対応可能なことである。

【0032】さらには核酸にはアデニンとチミン（あるいはウラシル）、シトシンとグアニンがそれぞれ相補的な関係にあり、水素結合によって結合することはよく知られているが、色素部分がこれら核酸塩基のいずれとも相補的な結合をしないことが望ましい。

【0033】さらには複数のDNA (RNA) プローブ試薬用色素をポリヌクレオチドに結合して感度を高めようとする場合には、色素部分どうしの立体障害や会合を考慮すべきである。なんとすれば立体障害によりポリヌクレオチド鎖への付加反応が起こらなかったり、あるいはポリヌクレオチド鎖に複数個入っているが、会合により光学的な吸収スペクトルが変化することが考えられるからである。

【0034】プローブ試薬は吸収スペクトルによって検出する場合には測定波長領域に光の吸収があること、蛍光スペクトルによって検出する場合には励起光によって有効に励起され且つ蛍光スペクトルが測定波長領域にお

いて十分な蛍光を示すことが要求される。

【0035】さらには色素部分をペンダントしたことによって溶媒に対する溶解性や検索すべきDNA (RNA) の塩基との相補性が大きく変化しないことが望まれる。

【0036】以上のような条件を満足する色素部分としては、シアニン系色素、メロシアニン系色素、ローダシアニン系色素、オキソノール系色素、スチリル色素、ベーススチリル色素、カルボシアニン系色素、クマリン誘導体、キサンテン色素、スピロピラン色素、スクアリウム色素、クロコニウム系色素、キノン系色素、フタロシアニン系色素、アズレニウム系色素、などの色素およびそれらの誘導体およびそれらの前駆体が挙げられる。

【0037】これらの色素のモル吸光係数は $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 、より好ましくは 1×10^5 以上であるものが好ましい。

【0038】これらの色素の中でシアニン、またはメロシアニン系色素はモル吸光係数 (ϵ) が約 10^5 であり、近赤外に吸収を持ち、検出の際に生体由来の不純物の影響を受けない（生体由来の不純物の多くは長波長に吸収をもたない）ことから特に好ましく用いられる。

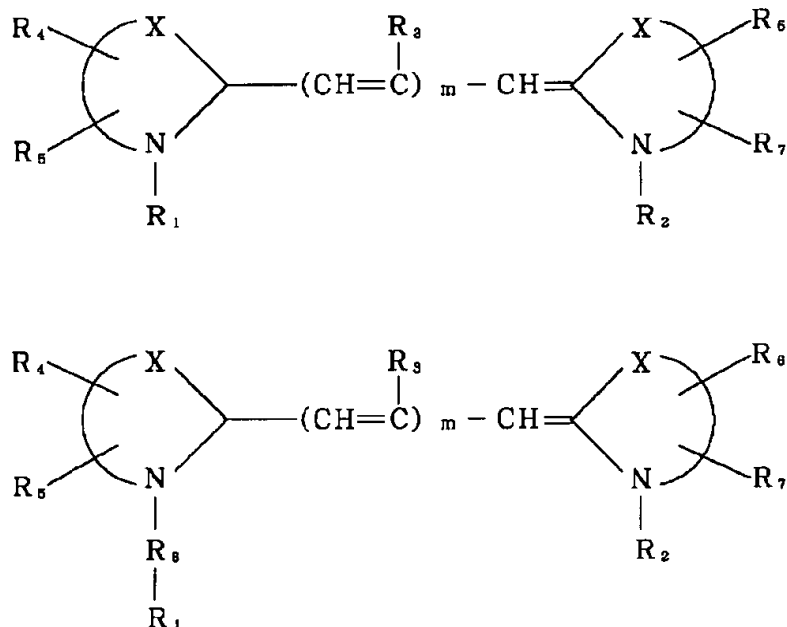
【0039】以下に示したメロシアニン色素を例に本発明の色素を説明すると、ベンゾオキサゾール環などの含窒素複素環を有し、この窒素原子にアルキルが結合しているのが一般的な構造である。よって核酸におけるプリン誘導体やピリミジン誘導体と同様、この窒素原子にアルキルに代わって結合する形で糖をグルコシド結合させることができる。なお、色素に余分なアミノ基がある場合にはこれをイソブチル基やベンジル基で保護しておく。

【0040】

【外2】

7
メロシアニン色素

8



(XおよびYはO, S, SeおよびC(CH₃)₂でmは1から4までの整数である。R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈のうちすくなくとも1つは糖類とくに環状糖類であり、他はベンゼンおよびナフタレンおよびそれらの誘導体、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ-ないしジハロゲン置換ピリジン、モノ-ないしジハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルフォニルハライド、酸ハライド、ヒドロキシスクシンイミド 30 エステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド、グリオキサールおよびアルデヒドなどから成る。)

【0041】以上の反応はリン酸、糖、色素、保護基のみの化学反応でいずれも大量に原料を入手でき、DNAプローブ試薬用色素を大量に得ることができる。

【0042】糖と色素との結合方法は例えば色素合成法やヌクレオチド合成方法の応用が可能である。すなわち、色素合成方法の応用においては色素の前駆体から糖 40 をアルキル基の1つとして合成することもできる。

【0043】リン酸化反応については従来の核酸合成と同様のリン酸化反応を応用できる。

【0044】ポリヌクレオチドへのDNAプローブ試薬用色素の付加反応は、保護基により副反応を抑制し核酸を1つずつ伸ばしていく既知のポリヌクレオチド人工合成方法とまったく同様である。

【0045】DNAプローブ試薬用色素が結合されるポリヌクレオチドとしては核酸から人工的に合成されたポリヌクレオチドでもよいし、生体から抽出したDNA由 50

来のものであってもよい。

【0046】本発明のDNAプローブ試薬合成工程はおもに6つのステップに分類される。1つめのステップはDNAやポリヌクレオチドの3'側を担体に固定することである。これにより3'側を保護すると同時に、反応後に不純物との分離精製が簡単に効率よく行える。このとき既に5'末端はDMTr基で、リン酸はシアノエチル基で、塩基にアミノ基がある場合にはイソブチル基やベンジル基で保護されていることが望ましい。2つめのステップは5'末端を保護していたDMTr基をトリクロロ酢酸などを用いてはずし、ヒドロキシ基にする。3つめのステップはDNAプローブ試薬用色素をテトラゾールと反応させてプロトン付加により活性化したものを先程のヒドロキシ基と反応させ、ポリヌクレオチド鎖に色素付加されたDNAプローブ試薬とする。4つめのステップは無水酢酸/ピリジンで未反応の5'-ヒドロキシ基をキャッピングする。5つめのステップはヨウ素/水/ルチジン/THFで亜リン酸部を酸化する。さらに色素を複数個付加させる場合にはステップ3において5'末端をDMTrで保護されたDNAプローブ試薬用色素を用いて、1から5までのステップを繰り返して色素を付加する。なお、ステップ1から5までの反応収率はおよそ99%であり、本発明によればDNAプローブ試薬に色素を定量的に導入することが可能である。6つめのステップは保護基をはずすことである。リン酸基からシアノエチル基をはずし、担体から3'末端をはずし、塩基の保護に用いたイソブチル基やベンジル基をはずす。

【0047】以上の工程を半自動的に行える装置も市販

されている。例えばAPPLIED-BIOSYSTEMS社MODEL 381Aなどを用いて同様のDNAプローブ試薬を合成することができる。

【0048】また酵素的にポリヌクレオチドに取り込ませることも可能でこの場合には5'トリリン酸(酵素的反応の場合にはβ-シアノエチルフォスフォロアミダイドではない)を用い、3'側に伸ばしていくこともできる。

【0049】本発明のモノヌクレオチド類似色素及びDNAプローブの合成法は以上述べた合成法に限定されず、他の方法でも合成できる。

【0050】

【実施例】

実施例1.

DNAプローブ用モノヌクレオチド類似色素の合成例

図1に示した反応スキーム(The Cyanine Dyes And Related Compounds, Frances M. Hamer著などの常法)に従って、15.9gの2,3,3-Trimethyl-indolenin (mw. 159.23)を15.6gのEthyl Iodide (mw. 155.97)に加え、70℃で3時間加熱還流した。析出した赤色結晶を濾過してTHFで洗浄後、エタノールで再結晶した。結晶30gと酢酸ナトリウム7.5g (mw. 82.05)を300mlの無水酢酸に溶解し、28.5gのグルタコンアルデヒドジアニリル塩酸基 (mw. 284.79)を加えて70℃で1時間加熱した。結晶を濾別しイソプロピルエーテルで洗浄、つづいて水洗した後、風乾した(以下Et体)。

【0051】15.9gの2,3,3-Tremethyl-indoleninを溶解させたピリジン溶液500mlに33.4gの1-Iode-5-dimethoxytrityl-2-deoxy-D-ribose (mw. 546.43)を加えて70℃で3時間反応させた。赤色結晶が析出し、これを濾過してTHFで洗浄後エタノールで再結晶した(以下R体)。

【0052】Et体 (mw. 470.41)とR体 (mw. 705.66)を等モルとりメタノール溶液とする。冷却しながら5%HI水溶液1.5等量をメタノールで希釈して滴下した。60℃で2時間加熱還流し、室温にて1晩放置した。結晶を濾別し、イソプロピルエーテル、n-ヘキサン、水の順で洗浄し、真空乾燥して結晶を得た。これをエタノールで3回再結晶を行なった(収率35%, mw. 1082.94)。

【0053】このヌクレオチド類似色素を図2に示した方法で2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルフォスフォジアミダイトを糖の3'水酸基に作用させリン酸化し、イオン交換樹脂カラムで精製を行ない、DNAプローブ試薬用ヌクレオチド類似色素とした。リン酸化は元素分析、NMR、UVスペクトルなど

を用いて確認した。

【0054】1-{1,1-Dimethyl-2-(7-(1,1-dimethyl-3-ethyl-indolin-2-ylidene)-1,3,5-heptatrienyl)-1H-indolium iodide}-3'-(β-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidate)-5'-dimethoxytrityl-2'-deoxy-D-ribose (総収率5%, 収量6.4g, HPLC純度99%以上、元素分析C₄₄H₇₆N₄O₇PIとして計算値C:H:N=64:36:4、実測値C:H:N=64:36:4、mw. 1315.19)

【0055】実施例2.

(1) DNAプローブ試薬の合成

実施例1にて合成したDNAプローブ試薬用モノヌクレオチド類似色素とAPPLIED-BIOSYSTEMS社MODEL 381Aを用いて合成した大腸菌ファージM13mp13ssDNAに部分的に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド中間体(図3)を原料とし、DNAプローブを調製した。反応はすべてアルゴン雰囲気下で行なった。

【0056】前述したように本発明のDNAプローブ試薬合成工程を固相で行う場合にはおもに6つのステップに分類される。

【0057】1つめのステップはDNAやポリヌクレオチドの3'側を担体に固定することであるが、図3に示したDNAシンセサイザーで合成したポリヌクレオチドの中間体は既に3'側を担体に固定され、5'末端はDMTr基で、リン酸はβ-シアノエチル基で、塩基にアミノ基がある場合にはイソブチル基やベンジル基で保護されているので省略した。なお担体はCPG(Controlled Pore Glass)などにシロキサン結合で3'を固定するのが一般的である。

【0058】2つめのステップはポリヌクレオチド中間体にトリクロロ酢酸(3%wt/volジクロロメタン)を反応させる(溶液がオレンジ色を呈し、5'末端を保護していたDMTr基がはずれ、ヒドロキシ基になる。)

【0059】3つめのステップは実施例1で合成したDNAプローブ試薬用色素を0.5Mテトラゾール無水アセトニトリル溶液を反応させてプロトン付加により活性化したものを、ポリヌクレオチド中間体に加え、ヒドロキシ基と反応させ、ポリヌクレオチド鎖にリン酸エステル結合でヌクレオチド類似色素を付加した。第4、第5のステップはそれぞれキャッピング、酸化である。

【0060】さらに色素を複数個付加させる場合には1から5までのステップを繰り返してリン酸エステル結合によりヌクレオチド類似色素を付加する。なお、ステップ1~5からまでの反応収率はおよそ99%であり、本

発明によればDNAプローブ試薬に色素を定量的に導入することが可能であった。本実施例では色素を1、2、3個つけた3種類のDNAプローブ前駆体を合成した。

【0061】4つめのステップでは保護基をはずす。

【0062】濃アンモニア水で2時間処理してリン酸基からシアノエチル基を脱離し、同時に担体とポリヌクレオチドの結合を切った。塩基の保護に用いたイソブチル基やベンジル基があるのでさらにアンモニア中で55℃で8時間加熱して保護基をはずした後逆相高速液体クロマトグラフィー(RHPLC)で精製しDNAプローブ試薬とした。

【0063】このDNAプローブ試薬水溶液は784nmに $\epsilon 1.75 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の吸収ピークを持ち、半導体レーザー($\lambda 784 \text{ nm}$)による励起で818nm付近に強い蛍光を発した。

【0064】(2) ハイブリダイゼーション

ホルムアミド150ml、20×SSC90ml、50×Denhardt液30ml、20%SDS7.5ml、0.5MEDTA(pH8)6ml、サケ精巢DNA(10mg/ml)3ml、H₂O、1本鎖に変性した大腸菌ファージM13mp18(100ng/ml)20mlの組成のハイブリダイゼーション混液を用意した。

【0065】一方、0.1MMgClを含むリン酸緩衝液-生理食塩水2.5mlに(1)のヌクレオチド類似色素が1unitから3unitまでの3種類のDNAプローブ試薬を各々濃度10μg/mlとなるように添加、混合した。

【0066】ハイブリダイゼーション液100μlと3種類のDNAプローブ試薬溶液100μlと各々混合し80℃で10分間放置し、ゆっくりと室温に戻し反応混合液を3種類得た。

【0067】電気泳動から、上記反応混合液内ではDNAプローブ試薬とM13mp18とはハイブリダイゼーションしていることが確認された。

【0068】3種類の反応混合液はDNAプローブ試薬水溶液と同じ波長に吸収や蛍光を有し、各々ヌクレオチド類似色素に比例した吸光度であった。このことはランバート・ベールの法則に従い、定量的に標識できることを示している。

【0069】更に、上記DNAプローブ試薬を用いるこの吸光度による定量法は再現性も良好であった。

【0070】比較例1. H-ホスホネート法によりDNAプローブを調製した。実施例2と同様、図3で示されるポリヌクレオチド中間体を合成した。ヨウ素/ピリジン/水(32mg/2.45ml/0.05ml)を用いてヨウ素酸化を先に行っておく。

【0071】実施例2の第2ステップ同様の脱トリチル剤でポリヌクレオチド中間体5'末端のトリチル基を脱する。

【0072】H-ホスホネートモノマーとして0.2M 5'-DMTr-Deoxyadenosine (N 6-Benzoyl) H-phosphonate Triethylammonium (Sigma Chemical Co. 製)を用いた。

【0073】H-ホスホネートモノマーを窒素雰囲気下で0.2ml取り、アセトニトリル/ピリジン(1/1)混合溶液0.2mlに溶解し、これをポリヌクレオチド中間体5'末端に反応させ縮合する。縮合剤として塩化ビバロイル/アセトニトリル/ピリジン(0.7ml/0.7ml/0.2ml)を加えた。

【0074】以上の操作を実施例2と同様に1回から3回まで行った3種類のものを作成した。

【0075】四塩化炭素で2、3回洗浄後、1.5Mエチレンジアミン四塩化炭素溶液0.4mlを5分間作用させ、四塩化炭素、アセトニトリルで洗浄し、H-ホスホネートの水素をエチレンジアミンで置換して色素とのスパーサーとした。

【0076】フルオレセインイソチオシアネート(FITC)30mMをDMF/炭酸ナトリウム緩衝液(2/8)混合溶媒に溶解したものを、ポリヌクレオチドにたいして20モル当量加え暗所、42℃で48時間反応させた。

【0077】未反応のH-ホスホネート部位を酸化した後、実施例2の第4ステップ同様、担体から切断、脱保護を行い、逆相高速液体クロマトグラフィーで精製しDNAプローブとした。

【0078】色素にFITCを用いたので島津分光蛍光光度計を用い、励起波長490nm、発光モニター波長515nmで測定を行った。

【0079】FITCを1個導入したDNAプローブの蛍光強度をFITCの蛍光強度と比較すると約0.5であった。

【0080】FITCを1個、2個、3個導入したものを比較すると蛍光強度は1次の比例関係ではなかった。

【0081】また上記DNAプローブの蛍光強度は、微妙な合成条件に左右されて合成する度に変化して一定しなかった(FITCと比較して約0.1~0.6の間にばらつく)。

【0082】DNAプローブとして再現性がないので、これを実施例2と同様の操作でM13mp18とハイブリダイゼーションさせても、定量性は得られなかった。

【0083】実施例3. 実施例1のヌクレオチド類似色素まで同様に合成した。ただし5' DMTr-O基の代わりに水酸基とした。

【0084】図4に示した方法で5'トリリン酸化反応を行い、脱保護を行いDNAプローブ試薬用ヌクレオチド類似色素とした。

【0085】プラスミドpBR322を制限酵素Bgl I、Hinc II、BamHIで切断したもの60pm

0.1/mlをDNA溶液として用いた。

【0086】DNA溶液5 μ lを滅菌水で10 μ lで希釈し、90℃で1分間加熱した。0℃で2分間冷却し、12000rpmで数秒間遠心した。250mMカコジル酸ナトリウム、20mM塩化コバルト、10mMDTT（ジチオスレイチトール）を含むトランスフェラーゼバッファ5 μ lを加えた。ヌクレオチドトランスフェラーゼを1 μ l加え、滅菌水で50 μ lまで希釈した。37℃で30分反応させた。7.5m酢酸アンモニウム25 μ l、99%冷エタノール150 μ lを加え、-70℃で15分静置した後、12000rpmで30分遠心分離し沈殿を回収した。

【0087】これを高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミド電気泳動等で精製しDNAプローブ試薬とした。

【0088】実施例2のような化学的なポリヌクレオチド合成でなくとも、このような酵素的な反応を利用すれば5'リン酸でもポリヌクレオチド化でき、DNAプローブ試薬とすることができた。

【0089】実施例4、図5に示した反応で、N-水素型色素を1-Iode-5-dimethoxytrityl-2-D-riboseと反応させ、実施例1と同じヌクレオチド類似色素を得た。実施例1と同様の手段で色素の糖部分の3'末端をリン酸化し、これをカラム精製してDNAプローブ試薬用ヌクレオチド類似色素を得た。（総収率10%、元素分析による純度99%以上、mw. 1285.38）

【0090】実施例5、ヌクレオチド類似色素としてアズレン系色素を図6に示した方法で合成した。

【0091】デオキシリボースとアズレンからFriedel-Crafts反応を利用して1-(1-Iode-5-dimethoxytrityl-2-deoxy-D-ribose)-azuleneを合成した。

【0092】1当量の1-Cyclobutene-3,4-dione-1,2-diol (3,4-Dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione)と1当量の上記アズレン-糖反応物と1当量のアズレンをトリエチルアミン存在下、n-ブタノール中107℃で反応させた。実施例1と同様の手段で色素の糖部分の3'末端をリン酸化し、これをカラム精

製してDNAプローブ試薬用ヌクレオチド類似色素を得た。（総収率15%、元素分析による純度99%以上）

また、このDNAプローブ試薬用ヌクレオチド類似色素を用いて実施例2の方法でDNAプローブ試薬を合成できた。

【0093】実施例6、1-Iode-5-dimethoxytrityl-2-deoxy-D-riboseの代わりに4-O-ethyl-6-dimethoxytrityl-D-glucoseを原料として用いて実施例1と同様のR体を合成し、以下実施例1と同様の反応でDNAプローブ試薬用ヌクレオチド色素を合成した。

【0094】実施例1のようにペントースでなくともヘキソースでも同様のDNAプローブ試薬用ヌクレオチド色素を合成できることが確認された。

【0095】

【発明の効果】DNAプローブ試薬用色素合成過程はリン酸、糖、色素、保護基のみの化学反応であり、いれも大量に原料を入手でき、DNAプローブ用色素を多量に得ることができる。

【0096】更に、DNAやポリヌクレオチドへのDNAプローブ用色素付加反応は簡便かつ高収率で、且つ1回の操作で色素が1つつ導入されるので、本発明のDNAプローブ試薬を用いれば定量的に検出が行え、かつ多量に導入することが可能なので検出感度も向上した。

【0097】また、検索したい塩基配列によらず末端に色素を導入することができるので汎用性を得ることもできた。

【図面の簡単な説明】

【図1】モノヌクレオチド類似色素の合成スキームの一例（1）

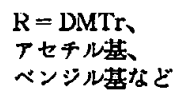
【図2】モノヌクレオチド類似色素の合成スキームの一例（2）

【図3】実施例2で用いるポリヌクレオチド中間体

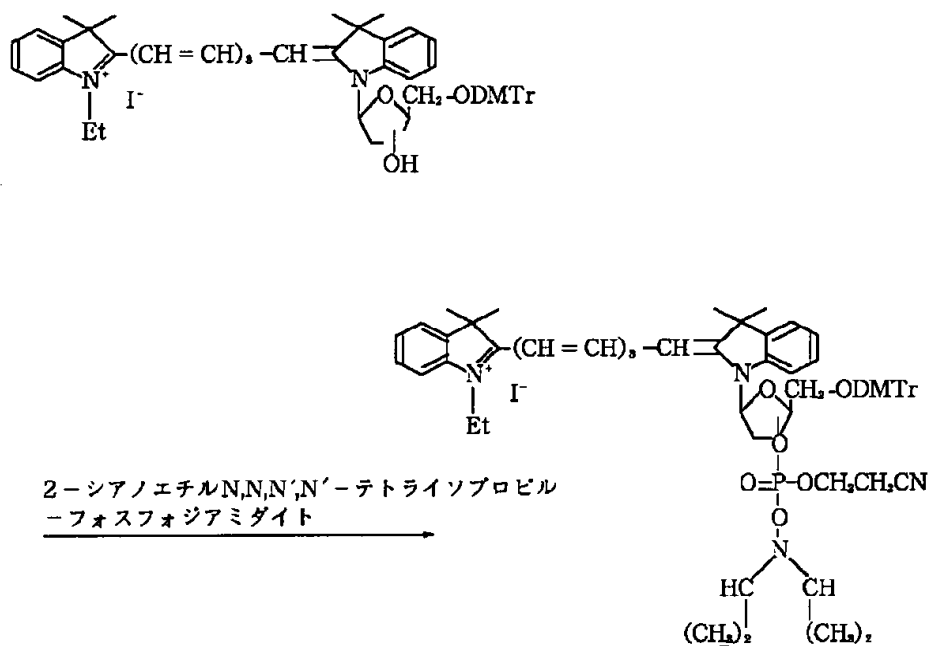
【図4】モノヌクレオチド類似色素の合成スキームの一例（3）

【図5】モノヌクレオチド類似色素の合成スキームの一例（4）

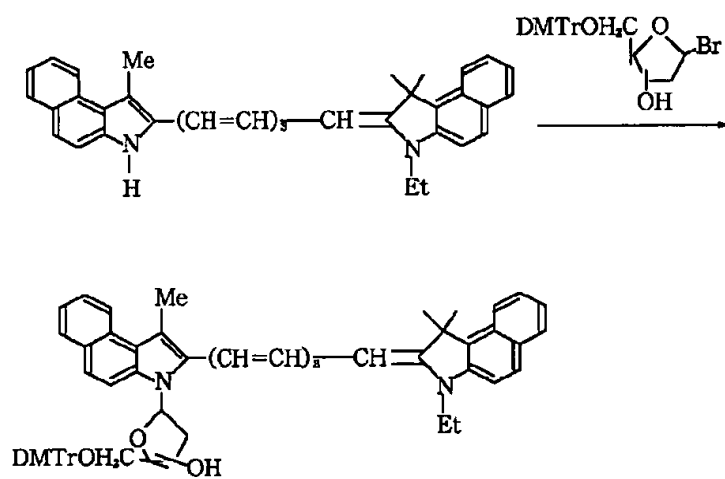
【図6】モノヌクレオチド類似色素の合成スキームの一例（5）

CN1C=C(C)C2=CC=CC=C12

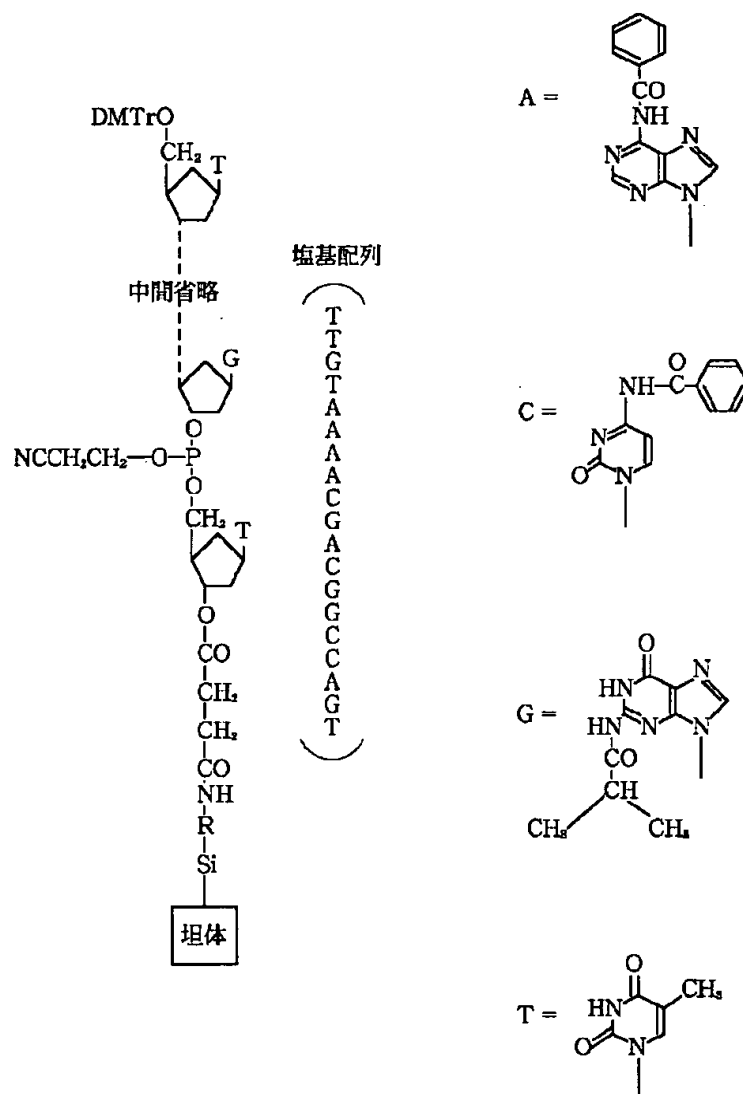
【図2】



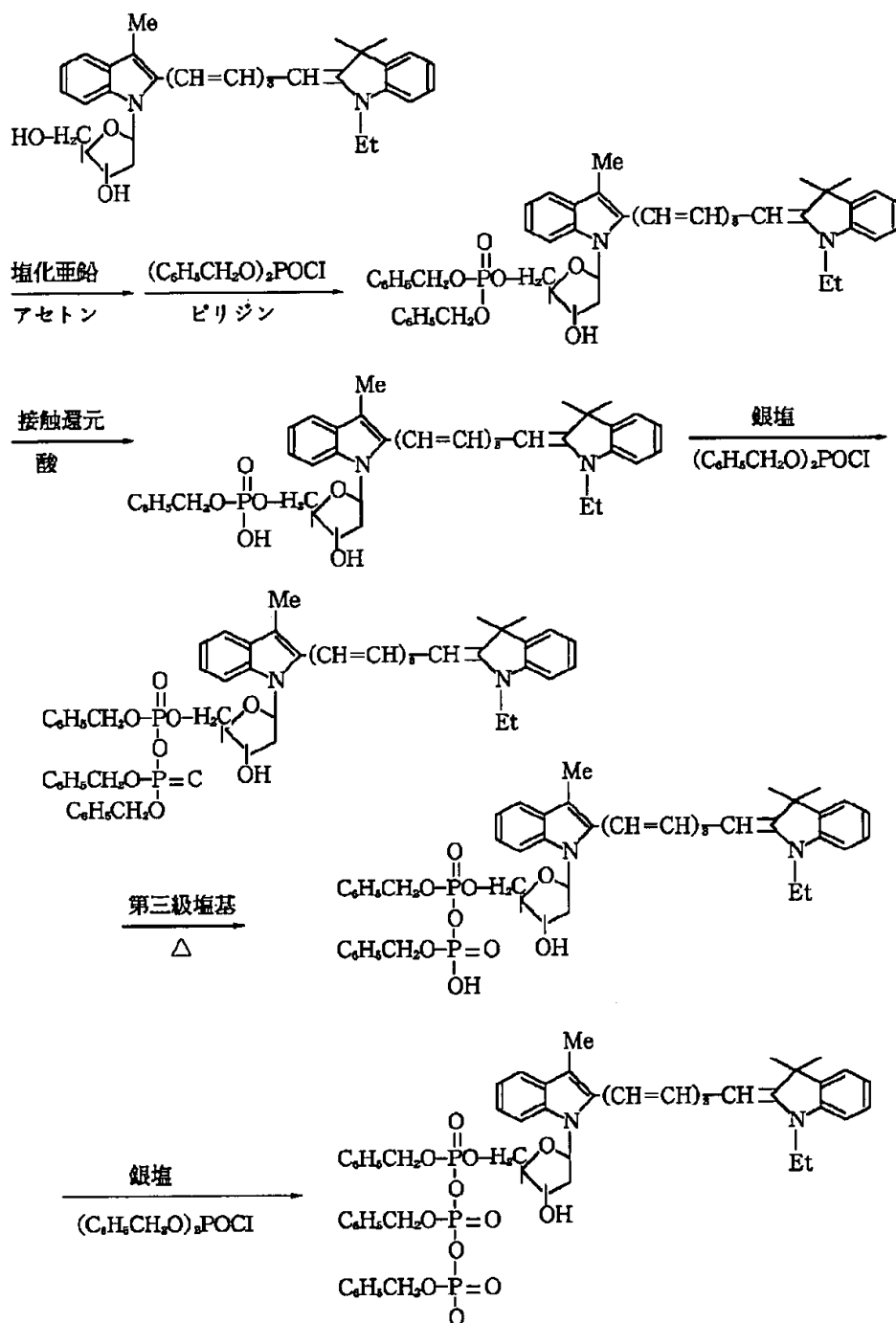
【図5】



【図3】



【図4】



【図6】

